UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS RIFAMPICIN AUF DIE VERMEHRUNG AUSGEWÄHLTER ADENOVIRUSTYPEN ALLER 4 UNTERGRUPPEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

MONIKA SCHÖNER

Saarbrücken

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität des Saarlandes Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. Dr. phil., Dipl.-Chem.
W. ZIMMERMANN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS RIFAMPICIN AUF DIE VERMEHRUNG AUSGEWÄHLTER ADENOVIRUSTYPEN ALLER 4 UNTERGRUPPEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973
vorgelegt von

Monika Schöner, geboren am 11. 7. 1948 in Dillingen/Saar

DEKAN: Professor Dr. med. H. KULENKAMPFF
REFERENT: Professor Dr. med. R. WIGAND

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündlicher Promotionstermin am 19. 7. 1973

MEINER FREUNDIN

MARGIT BUCHHOLZ

GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542725_0072

INHALT

	Seite
EINLEITUNG	1
METHODIK UND MATERIAL	3
ERGEBNISSE	6
DISKUSSION	17
ZUSAMMENFASSUNG	2o
LITERATUR	21

EINLEITUNG

Das Antibiotikum Rifampicin (Strukturformel s. Abb. 1) ist ein Derivat des Rifamycin SV. Es wirkt auf grampositive und die meisten gramnegativen Erreger bakteriostatisch, ebenso auf Tuberkelbakterien. Rifampicin hemmt das Wachstum von Vaccinia und anderen Pockenviren, ebenso von Adenovirus Typ 1 (SUBAK-SHARPE et al. (1969)). In ihrer Arbeit über die Unterdrückung der Interferoninduktion durch Rifampicin in Hühnerembryonen-Zellkulturen fanden USTACELEBI et al. (1972) eine vollständige Hemmung der Interferoninduktion bei Adenovirus Typ 1, 5 und 12.

In der nachfolgenden Abhandlung wollen wir die Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf die Vermehrung ausgewählter Adenovirustypen aller 4 Untergruppen untersuchen.

Folgende Fragen versuchen wir nacheinander zu beantworten:

1) Ist das Antibiotikum Rifampicin toxisch für die Gewebekulturzellen?
2) In welcher Konzentration hemmt der Inhibitor?
3) Ist die Wirkung des Inhibitors reversibel?
4) Bis zu welcher Zeit im Vermehrungszyklus ist der Inhibitor noch wirksam?

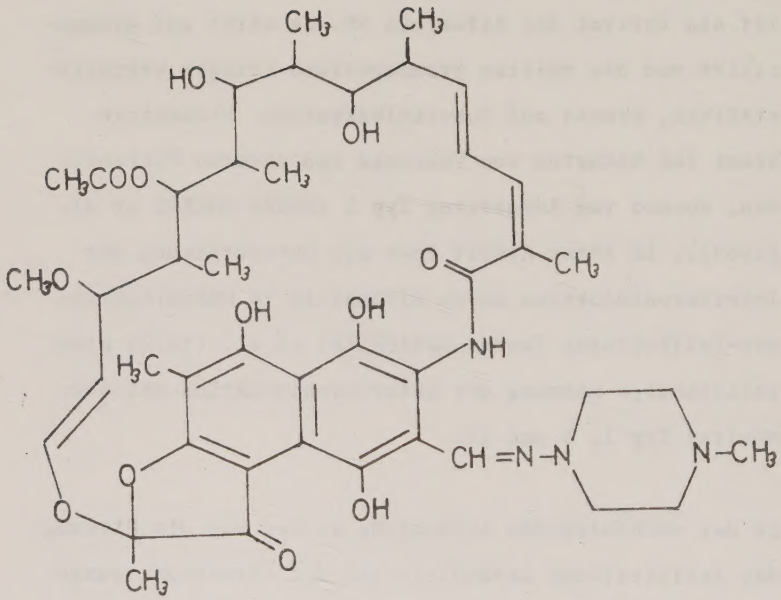

Abb. 1: Strukturformel des Antibiotikums Rifampicin

METHODIK UND MATERIAL

1. Zellkulturen

Wir verwendeten HeLa-Zellkulturen Stamm Düsseldorf (HeLa D) in guter Qualität (meist 3 Tage alt). Das Wachstumsmedium enthielt 5 %, das Erhaltungsmedium 2 % Kälberserum. Der Mediumwechsel vor der Beimpfung erfolgte mit Eagle's MEM + 2 % Kälberserum.

2. Viren

Die Prototypstämme der Typen 1, 3, 4, 12 und 19 wurden in HeLa-Zellkulturen gewonnen. Die Virustitration erfolgte ebenfalls in HeLa-D-Kulturröhrchen. Die Typen 1, 3 und 19 wurden außerdem auf menschlichen embryonalen Nierenzellen bis zum Endpunkt titriert. Für die Versuche verwendeten wir eine Virusdosis, die 48 Stunden nach Infektion (hpi) zu einem annähernd vollständigen cytopathischen Effekt (CPE) führte. Unter diesen Bedingungen lag die Multiplizität der Infektion für Typ 19 um 1,o, für die Typen 1 und 3 bei etwa 2o ID_{5o} pro Zelle.

3. Hemmversuche

HeLa-Kulturröhrchen wurden nach Absaugen des Mediums mit o,5 ml Virus in geeigneter Verdünnung inokuliert und 2 Stunden bei 37^{o} C im Brutraum auf einer Schaukel

(zur gleichmäßigen Verteilung) inkubiert. Nach der zweistündigen Adsorptionszeit wurde der virushaltige Überstand vorsichtig abgesaugt, in einem sterilen Gefäß gesammelt und verworfen. Die Röhrchen wurden dann mit je 2 ml vorgewärmter Hankslösung dreimal gewaschen. Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml Eagle's MEM + 2 % Kälberserum eingegeben. Bei jedem Versuch blieben 6 Röhrchen ohne Inhibitor. Statt des Rifampicins erhielten sie o,25 ml Hankslösung. Drei Röhrchen wurden dann sofort eingefroren - sie stellten den Ausgangswert dar -, die 3 restlichen wurden nach einer Inkubation von 48 Stunden geerntet (Endwert).

Rifampicin wurde in 5facher Konzentration mit o,25 ml/ Röhrchen eingegeben. Da die Röhrchen bereits 1 ml Medium enthielten, war die endgültige Konzentration dann wie gewünscht. Die rifampicinhaltigen Kulturen wurden ebenso wie die Viruskontrollen 48 hpi durch Einfrieren geerntet.

4. Virustitration

Zur Bestimmung des Gehaltes an infektiösem Virus wurden die Proben nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen in Verdünnungsstufen mit dem Faktor 4 auf HeLa-Kulturröhrchen verimpft und der auftretende CPE bis 3 Tage nach der Infektion beobachtet. Bei dieser kurzen Inkubationsdauer erfaßt man zwar nur einen geringen Bruchteil der

Virusmenge; jedoch ist der Vergleich verschiedener Proben des gleichen Typs hiermit mit großer Sicherheit möglich.

5. Hämagglutinationsteste

Das Phänomen der HA wird zur raschen Titration des Virusgehaltes einer Suspension angewandt. Die HA wurde bei Adenovirus Typ 19 mit Rattenblutkörperchen vorgenommen, bei den übrigen Virustypen wurde von einer Bestimmung der hämagglutinierenden Aktivität Abstand genommen.

6. Komplementbindungsreaktion

Zum Nachweis des gruppenspezifischen Adenovirusantigens verwendeten wir eine Mikromethode nach WIGAND (1956). Die Antigene wurden jeweils mit dem Faktor 4 verdünnt und mit Antikörper-haltigem Rekonvaleszentenserum in konstanter Dosis und abgestuften Komplementmengen zur Reaktion gebracht. Als Antigentiter galt diejenige Antigenmenge, die noch eine Komplementeinheit verbrauchte.

7. Rifampicin

Wir verwendeten das Präparat Rimactan der Firma Ciba. Eine Ampulle (2o mg) wurde in 1o ml Hanks aufgelöst und bis zum Gebrauch eingefroren aufbewahrt.

ERGEBNISSE

1) Ist der Inhibitor toxisch?

Zu diesen Versuchen wurden unbeimpfte HeLa-Kulturröhrchen in zweifach abgestufter Verdünnungsreihe mit dem Antibiotikum Rifampicin inkubiert. Der toxische Effekt wurde mikroskopisch nach einem und zwei Tagen abgelesen.

Bei einer Dosis von 4oo µg/ml Rifampicin stellten wir nach zweitägiger Inkubation einen schwach toxischen (etwa 5o % der Zellen umfassenden) Effekt fest, der in den nachfolgenden Tagen allmählich zunahm. Durch Antibiotikamengen von 2oo, 1oo und 5o µg/ml ließ sich noch keine Toxizität auf unsere HeLa-Zellkulturen erzielen.

Der untere Grenzwert der Toxizität für das Antibiotikum Rifampicin auf HeLa-D-Zellkulturen beträgt 4oo µg/ml.

2) In welcher Konzentration hemmt der Inhibitor?

Mit verschiedenen Adenoviren beimpfte Kulturen wurden nach der oben beschriebenen Methode mit abgestuften Dosen des Inhibitors inokuliert. Verwendet wurden die Adenoviren Typ: 1, 3, 4, 12 und 19; sowie 1oo, 2oo und 4oo µg/ml Rifampicin. Nach einer 48stündigen Inkubation wurden die HeLa-Röhrchen durch Einfrieren geerntet. Darauf erfolgte noch ein zweimaliges Auftauen. Für jeden

Ansatz wurden stets 2 Gewebekulturröhrchen genommen. Der Inhalt beider Röhrchen wurde in einem vereinigt und zum Test auf Infektiosität und gruppenspezifisches komplementbindendes Antigen verwandt.

Die Ergebnisse der Konzentrationsversuche sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1:

Virustyp	Rifampicin	4oo ug	2oo µg	1oo µg	Viruskontrollen nach 2 Std.	nach 48 Std.
1	Inf.	< 1	16	128	< 1	128
	KBR	< 1	8	8o	< 1	16o
3	Inf.	8	32	128	< 1	128
	KBR	1o	4o	8o	< 1	16o
4	Inf.	4	4	4	< 1	16
	KBR	< 1	< 1	4	< 1	1o
12	Inf.	2	2	16	< 1	16
	KBR	< 1	< 1	8	< 1	16
19	Inf.	< 1	4	16	< 1	32
	KBR	< 1	16	32	< 1	128
	HA	< 8	16	128	< 8	256

Die Konzentration an Rifampicin, bei der eine vollständige Hemmwirkung erzielt wurde, liegt für alle 5 Adenovirustypen bei 4oo µg/ml. Bei einer Dosis von 2oo µg/ml ist meist ein partieller Hemmeffekt erzielt worden; in Anwesenheit von 1oo µg/ml wurde das Viruswachstum kaum gehemmt. Interessanterweise wurde der CPE in unseren Versuchen in keiner Weise beeinflußt.

Mehrere Einzelversuche mit Adenovirus Typ 19, bei dem zusätzlich auf Hämagglutination geprüft wurde, sind in Abbildung 2 festgehalten.

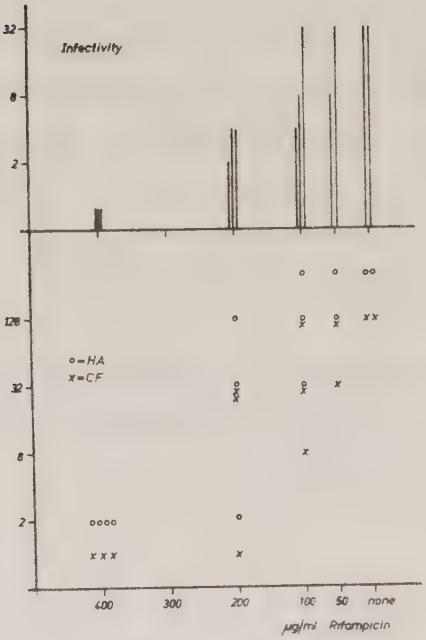

Abb. 2: Konzentrationsversuch von Rifampicin mit Adenovirus Typ 19.

Zeichenerklärung: o = HA = Hämagglutination
x = CF = Komplementbindungsreaktion

3) Ist die Wirkung des Inhibitors reversibel?

Rifampicin in einer Konzentration von 4oo µg/ml wirkte 24 Stunden auf die virusbeimpften Zellkulturen ein. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Kultur zweimal mit je 2 ml Hankslösung gewaschen und 1,25 ml neues

Medium ohne Rifampicinzusatz hinzugefügt. Nach 48stündiger Inkubation wurden die Röhrchen geerntet und ausgetestet im Vergleich zu dem Ansatz, in welchem der Inhibitor nicht entfernt wurde, sowie der 48stündigen Viruskontrolle.

Das Ergebnis der Austestung mit verschiedenen Adenovirustypen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Reversionsversuche

Virustyp	Viruskontrolle nach 48 Std.	Rifampicin 400 µg Reversion	Rifampicin 400 µg keine Reversion
1	Inf. 128	64	< 1
	KBR 160	80	< 1
3	Inf. 128	64	8
	KBR 160	40	10
4	Inf. 16	4	< 1
	KBR 10	8	< 1

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wird der hemmende Effekt von Rifampicin auf die Virusvermehrung nach Entfernung des Antibiotikums aufgehoben, wenn auch nicht immer vollständig.

4) Bis zu welcher Zeit im Vermehrungszyklus des Virus ist das Antibiotikum Rifampicin noch wirksam?

Um eine Beziehung zwischen der Hemmwirkung des Rifampicins und dem Virusvermehrungszyklus herstellen zu können, war es notwendig unter den gleichen Bedingungen, wie sie auch zu den Hemmversuchen benutzt wurden, eine Virusvermehrungskurve aufzuzeichnen. Die erste virusspezifische Aktivität fanden wir für 3 verschiedene Andenovirustypen 18 hpi (s. Tab. 3). Bei diesen Versuchen konnte das gruppenspezifische Antigen zuerst nachgewiesen werden; zwei Stunden später folgte der Nachweis der Infektiosität. Der Gipfel der Virusvermehrung lag zwischen 27 bis 36 Stunden nach der Beimpfung der Zellkulturen.

Tabelle 3: Virusvermehrungskurve

Virustyp	Latenzzeit	Maximum
19	Inf. 18 Std. KBR 16 Std.	27 - 3o Std.
1	Inf. 18 Std. KBR 16 Std.	36 Std.
3	Inf. 18 Std. KBR 16 Std.	36 Std.

Da die Austestungsergebnisse aller 3 Virustypen annähernd gleich waren, erwarteten wir dies auch für die Rifampicin-Zeitversuche. Die Versuchsbedingungen waren:
HeLa-Zellkulturen wurden mit den oben ausgetesteten Virustypen beimpft und nach einer zweistündigen Inkubation nach erprobtem Verfahren gewaschen. Nun fügten wir zu unterschiedlichen Zeiten Rifampicin in einer Dosierung von 4oo µg/ml hinzu. Die Zellkulturen blieben insgesamt 48 Stunden inkubiert und wurden danach gemeinsam durch Einfrieren geerntet.

Die Abbildungen 3, 4 und 5 veranschaulichen unsere Ergebnisse.

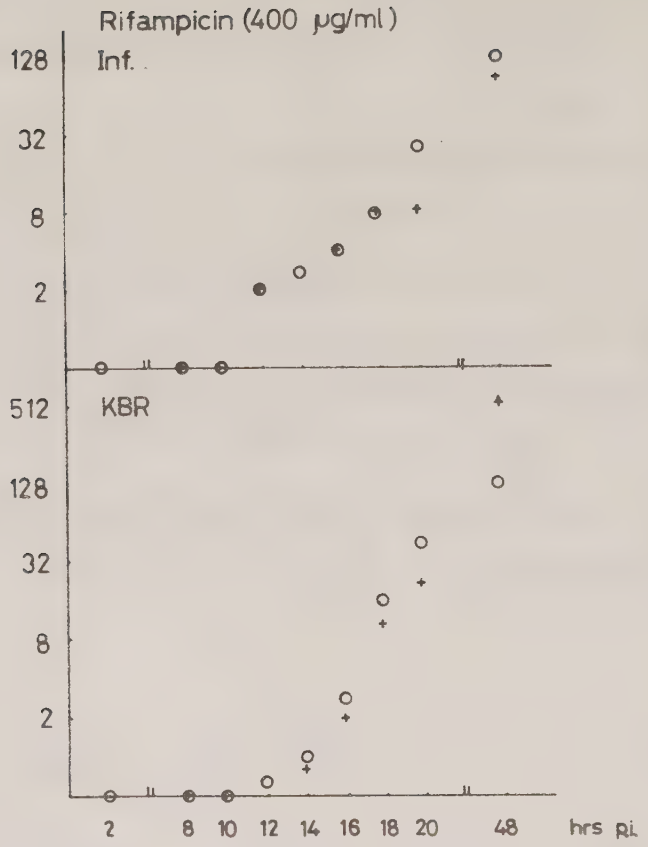

Abb. 3: Rifampicin-Zeitversuch mit Adenovirus Typ 1.

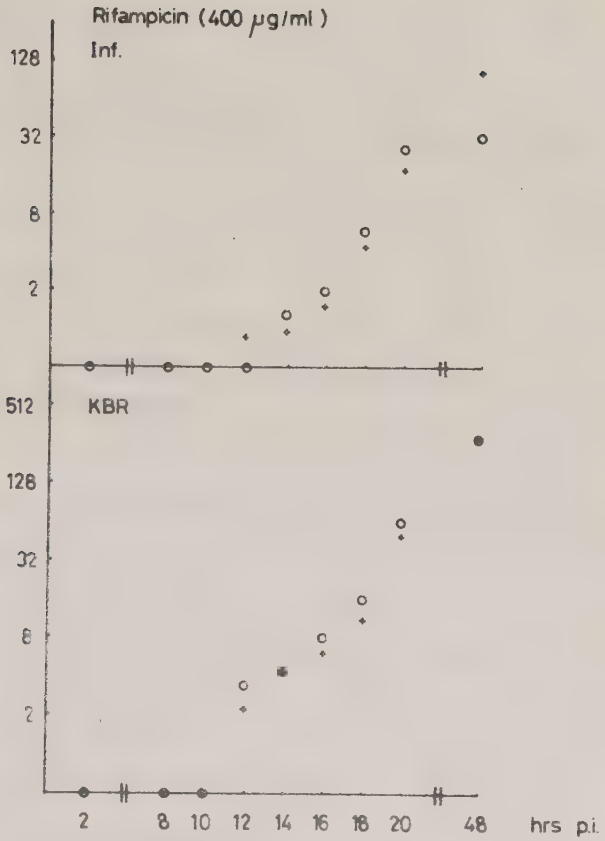

Abb. 4: Rifampicin-Zeitversuch mit Adenovirus Typ 3.

Zeichenerklärung: x, o = unterschiedliche Versuche
2 = 48 Std. nach Infektion stellen den Ausgangs- und Endwert dar.

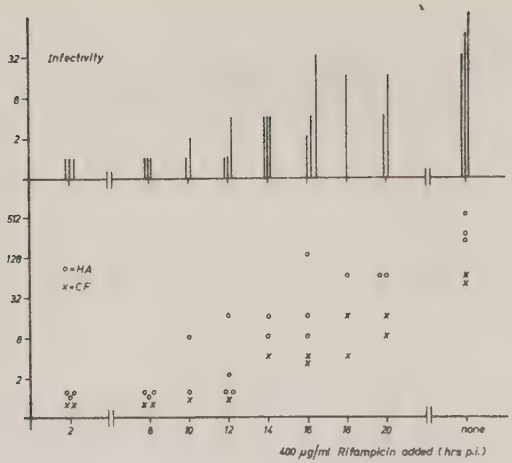

Abb. 5: Rifampicin-Zeitversuch mit Adenovirus Typ 19.

Wie erwartet, lagen die Werte für alle 3 Virustypen annähernd gleich. Eine vollständige Hemmung der Virusvermehrung erzielten wir noch durch Hinzugabe des Antibiotikums nach 8 - 1o Stunden. Der Hemmeffekt nahm in den weiteren Stunden rasch ab. Jedoch war die Virusvermehrung im Vergleich zur Viruskontrolle 48 Stunden auch dann noch vermindert, wenn Rifampicin 24 Stunden nach der Infektion zugegeben wurde.

DISKUSSION

Rifampicin hemmt das Wachstum von Adenovirustypen aller vier Untergruppen. Die in unseren Versuchen zu dieser Hemmwirkung benötigte Dosis lag allerdings an der Grenze zwischen noch nicht toxischem und toxischem Bereich. Im Unterschied zu unseren Versuchsergebnissen fanden SUBAK-SHARPE et al. (1969) eine Hemmwirkung des Rifampicins auf das Wachstum von Adenovirus Typ 1 schon bei einer Inhibitorkonzentration von 1oo µg/ml. Für die Adenovirustypen 1, 3, 4, 12 und 19 konnten wir in unseren Versuchen eine vollständige Hemmung des Viruswachstums mit 4oo µg/ml erzielen. Der CPE konnte jedoch in keiner Rifampicinkonzentration gehemmt werden. Die Toxizität des Antibiotikums für HeLa-Zellkulturen lag bei SUBAK-SHARPE et al. auch niedriger als in unseren Versuchen, nämlich um 15o µg/ml. Als Erklärung für diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Versuchsanordnungen gelten; auch bei der Toxizität waren die Bewertungskriterien unterschiedlich.

USTACELEBI und WILLIAMS (1972) untersuchten in ihrer Arbeit über die Unterdrückung der Interferonproduktion durch Rifampicin auch die Hemmwirkung des Antibiotikums auf die Adenovirustypen 1, 5 und 12 in HeLa-Zellen. Adenovirus Typ 1 und 5 zeigten bei einer Rifampicinkonzentration von 1oo - 15o µg/ml eine deutliche Hemmung ihres Wachstums; bei Adenovirus Typ 12 konnte jedoch inter-

essanterweise kein hemmender Effekt festgestellt werden. In unseren Versuchen fanden wir jedoch auch für diesen Virustyp eine eindeutige Hemmung des Viruswachstums durch Rifampicin (s. Tab. 1).

Mc CORMICK et al. (1972) zeigten in Versuchen mit menschlichen Embryonalnierenzellen (HEK-cells), daß Rifampicin in den Konzentrationen von 25, 5o und 1oo µg/ml das Wachstum von den Adenovirustypen 3, 4 und 7 nicht zu hemmen vermag, was mit unseren Versuchsergebnissen in Einklang steht.

Es stellt sich nun die Frage, ob die hemmende Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf das Viruswachstum auf die cytotoxische Wirkung zurückgeht oder ob es sich um eine echte Hemmung der Virusvermehrung selbst handelt. Als Hinweis auf eine echte Hemmung seien die Reversionsversuche in Erinnerung gebracht, deren Ergebnisse in Tabelle 2 festgehalten sind. Aus bisher noch nicht veröffentlichten Ergebnissen von WIGAND über die Hemmung des Wachstums von Adenoviren durch Inhibitoren geht ebenfalls hervor, daß nach Entfernung des Antibiotikums Rifampicin ein sehr rascher Anstieg des Viruswachstums resultiert. Schon 6 Stunden nach Wegnahme des Antibiotikums ist ein Ansteigen der Virusvermehrung zu verzeichnen, dessen Höhepunkt nach 1o Stunden erreicht ist. Ohne Rifampicinzusatz beginnt die Vermehrung des Virus erst nach 16 - 18 Stunden sichtbar zu werden und erreicht ihren Höhepunkt erst nach 27 - 3o Stunden.

Welcher spezielle Mechanismus der Virushemmung nun zugrunde liegt, ist noch weitgehend unbekannt. KATZ et al. (197o) fanden in ihren Versuchen über die Wirkung von Rifampicin (loo µg/ml) auf Vaccinia-Virus, daß das Antibiotikum zu einer Anhäufung von unreifen Viruspartikeln führt, während der letzte Schritt der Reifung verhindert wird. Auch bei diesen Versuchen war die Wirkung des Antibiotikums nach Entfernen von Rifampicin reversibel.

Ob nun die beobachtete Wirkung des Rifampicins auf die Adenovirustypen 1, 3, 4, 12 und 19 einem ähnlichen Mechanismus unterliegt ist eine Frage, deren Beantwortung einer biochemischen Untersuchung bedarf.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Antibiotikum Rifampicin hemmt das Wachstum von Adenovirustypen aller 4 Untergruppen. Die zur vollständigen Hemmwirkung notwendige Dosis war in unseren Versuchen mit 4oo µg/ml sehr hoch. Die Toxizität von Rifampicin für die Gewebekulturzellen lag zwischen 4oo und 8oo µg/ml. Die Wirkung des Inhibitors auf die Virusvermehrung ist reversibel, das heißt nach Entfernung des Antibiotikums ist ein rascher Anstieg der Virusvermehrung zu erkennen. Die Virushemmung ist daher wahrscheinlich nicht auf den toxischen Effekt von Rifampicin zurückzuführen, sondern ist eine echte Hemmung der Virusvermehrung. In Zeitversuchen erzielten wir noch 8 - 1o Stunden nach der Infektion mit einer Antibiotikakonzentration von 4oo µg/ml eine vollständige Hemmung der Virusvermehrung.

LITERATUR

KATZ, E., GRIMLEY, P. u. MOSS, B. : Reversal of anti-viral effects of Rifampicin. Nature 227, 1o5o - 1o51 (197o)

Mc CORMICK, D.P., WENZEL, R.P., SMITH, E.P. u. BEAM, W.E. jr. : Failure of Rifampin to inhibit adenovirus replication. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2, 326 - 328 (1972).

SUBAK-SHARPE, J.H., TIMBURY, M.C. u. WILLIAMS, J.F. : Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses. Nature 222, 341 - 345 (1969)

USTACELEBI, S., WILLIAMS, J.F. : Depression of interferon production in chick embryo cells by Rifampicin. J. gen. Virol. 15, 139 - 148 (1972)

WIGAND, R. : Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungs-Reaktion. Z.f.Hyg. 143, 188 - 214 (1956)

Herrn Professor Dr. med. R. WIGAND möchte ich für die Überlassung des Themas und die liebenswürdige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit meinen ergebensten Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. Dr. W. ZIMMERMANN danke ich für die Gewährung eines Arbeitsplatzes.

Frau I. MAURER sei für die Bereitstellung der Gewebekulturröhrchen aufrichtig gedankt.

Für die Bereitstellung des Antibiotikums Rifampicin möchte ich mich herzlich bei der Ciba AG - Wehr/Baden bedanken.

LEBENSLAUF

Vor- und Zuname:	Monika Schöner
Geburtsdatum:	11. Juli 1948
Geburtsort:	Dillingen/Saar
Wohnort:	6638 Dillingen/Saar, Am Wald 6
Familienstand:	ledig
Konfession:	katholisch
Beruf:	Ärztin

Schul- und Berufsausbildung:

vom 1.4.1954	bis	31.3.1958	Volksschule Dillingen
vom 1.4.1958	bis	3o.9.1966	Realgymnasium Dillingen
vom 1.1o.1966	bis	31.12.1972	Universität des Saarlandes Medizinische Fakultät

Eltern:	Willi Schöner, Alwine Schöner, geb. Lukas
Wohnort:	6638 Dillingen, Am Wald 6